

**Tierexperimentelle Untersuchungen
zur Nachwirkung längerer
Adrenalin-, Heparin- und
Histamingaben**

Annegret Bauke

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555208_0029

**Tierexperimentelle Untersuchungen
zur Nachwirkung längerer
Adrenalin-, Heparin- und
Histamingaben**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Annegret Bauke
geb. Müller
aus Frankfurt/Main

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. W. SEITZ

Dekan: Prof. Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 27.3.1962



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
PROBLEMATIK	5
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	7
Methodik	7
Versuchsreihen	7
Statistische Auswertung	11
DISKUSSION	19
ZUSAMMENFASSUNG	20
LITERATURVERZEICHNIS	22

In früheren Arbeiten haben MATHIES und Mitarbeiter (1-11) wahrscheinlich machen können, dass die Wirkung hyaluronidasehemmender Substanzen an eine Aktivierung des Nebennierenmarkes mit einer Katecholaminausschüttung gebunden ist. Am Beispiel der Acetylsalicylsäure, des Chloraethylbenzmethoxazons, des Prednisolons, des Phenylbutazons und der Moorbäder wurde gezeigt, dass ihre hemmende Wirkung auf das Hyaluronidase-Spreading bei adrenaletomierten Ratten ausbleibt.

Da der durch die gleichen Substanzen hervorgerufene Ascorbinsäure-Depletionseffekt der Nebennieren nach DOMENJOZ (12) bzw. MATHIES (7) bei hypophysectomierten Ratten ausbleibt, obwohl der hyaluronidasehemmende Effekt erhalten ist, kann eine Nebennierenrinden-Aktivierung nicht für das Zustandekommen des hyaluronidasehemmenden Effektes entsprechend wirksamer Substanzen verantwortlich gemacht werden.

Die Annahme, einer über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark laufenden Wirkung hyaluronidasehemmender Stoffe wurde durch Untersuchungsergebnisse von MATHIES (13) bzw. MATHIES, GLÜCK, POULANTZAS und SCHMIDT (14) erhärtet, nach denen Adrenalin sowohl bei intakten als auch bei adrenaletomierten Ratten eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität in gleicher Größenordnung hervorruft. Weiter haben MATHIES und Mitarbeiter (14, 15) nachweisen können, dass die Wirkung hyaluronidasehemmender Substanzen durch Pendiomid und Ergotamintartrat blockiert wird. Pendiomid ruft hierbei nach EICHHOLTZ (16) eine Nebennierenmark-Blockierung hervor, während Ergotamintartrat seinen adrenolytischen Effekt entfaltet.

Auch die hyaluronidasehemmende Wirkung der Katecholamine, Adrenalin und Noradrenalin ist durch Ganglienblocker und Adrenolytica aufzuheben.

MATHIES (13) und SCHEUFELE (17) haben gezeigt, dass die Hyaluronidasehemmung kein primärer Katecholamineffekt ist, sondern erst nach Ablauf einer gewissen Zeitspanne im Anschluss an die an der Pupillenweite feststellbare Katecholaminwirkung sichtbar wird. Nach Untersuchungen von MATHIES und SCHLIERF (18) wird die Hyaluronidasehemmung ausgelöst, wenn der Katecholamin-Blutspiegel von einem höheren auf ein niedrigeres Niveau absinkt. Dieses Absinken des Katecholamin-Blutspiegels erfolgt im Falle der hyaluronidasehemmenden Stoffe im Anschluss an eine vorherige Erhöhung durch Ausschüttung aus dem Nebennierenmark, bzw. experimentell nach i. v. Injektion von Adrenalin oder Noradrenalin. Wenn adrenaletomierten Tieren eine Adrenalindauerinfusion verabreicht wird, wird die Hyaluronidasehemmung erst im gewohnten Zeitabstand nach Absetzen der Infusion sichtbar. Sie tritt jedoch bereits während der Infusion auf, wenn zusätzlich der Katecholamin-Blutspiegel durch kurzfristige Applikation höherer Dosen weiter erhöht wird und im Anschluss daran wieder auf das durch die Infusion allerdings bereits überhöhte Niveau abfällt.

Dieses Verhalten legte die Vermutung nahe, dass im Anschluss an den genannten Katecholamineffekt weitere körpereigene Stoffe am Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Substanzen beteiligt sind. In dieser Hinsicht wurden von MATHIES (19), Heparin und Histamin näher untersucht. Mit beiden Substanzen lässt sich im Experiment eine Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings erzielen. Die Hemmung des Heparins ist durch Protaminsulfat, die des Histamins durch das Antihistaminicum Avil zu blockieren. Ebenfalls wird die Wirkung der untersuchten hyaluronidasehemmenden Stoffe, sowie die Hyaluronidasehemmung des Adrenalins und Noradrenalins durch Protaminsulfat und durch das Antihistaminicum aufgehoben. Es erscheint also möglich, dass Heparin und Histamin am Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Stoffe beteiligt sind und bei einem Katecholamin-Blutspiegelabfall aus den Mastzellen freigesetzt werden, in denen sie nach WERLE und AMANN (20) durch SO_3H -Gruppen chemisch aneinander gebunden sind.

In weiteren Untersuchungsreihen haben PROBST (21), SCHWANK (22), ESPER (23), FUMY (24), und HAUPT (25) die Wirkungsdauer nach Applikationsserien über längere Zeiträume untersucht. Am Beispiel der Acetylsalicylsäure, des Chloroäthylbenzmethoxazons, des Oestroneulfates, des Chloroquins und der Moorbäder wurde nachgewiesen, dass deren hyaluronidasehemmende Wirkung über 4 Wochen, in einigen Versuchsreihen bis zu 12 Wochen nach Applikationsende anhält, wenn die Medikation über 4 Wochen durchgeführt wurde. Da dieser über längere Zeit andauernde Effekt durch ein Adrenolyticum bzw. durch ein Antihistaminicum oder durch den Heparin-Inaktivator Protaminsulfat jederzeit aufgehoben werden kann, ist zu diskutieren, ob die hyaluronidasehemmenden Stoffe bei längerer Gabe zu einer anhaltenden Nebennierenmark-Aktivierung führen. Diese bedingt ihrerseits laufende Katecholaminausschüttungen, welche nicht kontinuierlich sondern, wie meist bei biologischen Vorgängen, rhythmisch erfolgen.

Hinsichtlich dieser Vermutung war noch zu klären, ob auch Adrenalin, Heparin und Histamin bei einer Applikation über 4 Wochen eine Hyaluronidasehemmung gleicher Dauer während des applikationsfreien Zeitraumes hervorrufen. Nur, wenn diese nicht festgestellt wird, kann gefolgert werden, dass der Dauereffekt hyaluronidasehemmender Substanzen lediglich auf einer Aktivierung des Nebennierenmarkes beruht, und dass an dem Wirkungsablauf nicht Dauereffekte anderer Faktoren der beschriebenen Wirkungskette beteiligt sind. Es wäre beispielsweise auch denkbar, dass durch einen durch die Applikationsserie gegebenen Anstoß die Mastzellen zu einer anhaltenden Heparin-Histamin-Freisetzung angeregt würden. Auch an weitere noch nicht erkannte Glieder der Wirkungskette im Anschluss an den Heparin-Histamin-Effekt wäre zu denken.

Da die bisherigen erwähnten Untersuchungen von MATHIES und Mitarbeitern (1, 13, 14, 19) mit Adrenalin, Histamin, Heparin mit i. v. Gabe vorgenommen wurden, war in Voruntersuchungen zu prüfen, ob der hyaluronidasehemmende Effekt dieser Substanzen in geeigneter Dosierung auch bei s. c. Applikation deutlich ist. Dieses war erforderlich, da bei den Versuchstieren eine tägliche i. v. Applikation über 4 Wochen aus rein versuchstechnischen Gründen nicht durchführbar war.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

METHODIK

Für die Versuchsreihen wurden männliche weisse Ratten verwendet, die bei Versuchsbeginn 135-225 g wogen. Um die Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität durch den sogenannten Spreading-Test durchführen zu können, wurden die Tiere mit Evipan narkotisiert (30 mg Evipan-Natrium pro 100 g Ratte). Nach WILHELM (26) besteht keine Beeinträchtigung der Hyaluronidase-Aktivität durch Barbiturate. Die Bauchhaut der Tiere wurde mit Pilka enthaart und dann nebeneinander eine Farbstoffquaddel (F_0, F_1, F_2, F_3, F_4) und eine Farbstoff-Hyaluronidasequaddel (H_0, H_1, H_2, H_3, H_4) gesetzt. Für die Farbstoffquaddeln wurde 0,6 %ige Evansblue-Lösung benutzt, wovon jeweils 0,1 ccm aus einer Tuberkulinspritze mit feiner, scharfer Kanüle streng intracutan injiziert wurde. Für die Farbstoff-Hyaluronidasequaddeln wurde eine Lösung von 150 I.E. Hyaluronidase in 2 ccm Evansblue-Lösung verwandt, wovon ebenfalls 0,1 ccm streng intracutan injiziert wurde, sodass also 7,5 I.E. Hyaluronidase in jeder Quaddel zur Wirkung kamen. Nach 10 min. wurde die Ausbreitung beider Quaddeln festgelegt und auf Zelluloidstreifen übertragen. Die Flächeninhalte wurden später planimetrisch bestimmt und sind in mm^2 angegeben. Nach MANDINAVEITIA (27, 28) verläuft die Ausbreitung zweiphasig und ist nur in den ersten 10 min. als echter Effekt der angewandten Hyaluronidase gesichert. Nach GIBIAN (29) beruht die aktive Diffusion einer intracutan gesetzten Quaddel auf dem Druck, den das Flüssigkeitsdepot auf seine Umgebung ausübt. Hyaluronidase setzt den Widerstand des umgebenden Gewebes gegenüber dem Druck der Quaddel herab.

Für die Versuche wurden folgende Lösungen hergestellt:

1. Adrenalin hydrochloricum in physiol. Kochsalzlösung 4 γ pro ccm.
2. Heparin in physiol. Kochsalzlösung 10 E. pro ccm.
3. Histamin in physiol. Kochsalzlösung 4 γ pro ccm.

Die Lösungen wurden zweimal in der Woche erneuert, damit die oben genannten Konzentrationen der Versuchssubstanzen erhalten blieben.

VERSUCHSGRUPPE A

1. Versuchsreihe

Um festzustellen, ob Adrenalin bei subcutaner Injektion einen hyaluronidase-hemmenden Effekt hat, wurde folgender Versuch durchgeführt:

5 Ratten, die 175-225 g wogen, wurden in Evipannarkose gequaddelt (F_0, H_0). Dann wurde Adrenalin 2 γ pro 100 g Tier subcutan injiziert. 15 min. (F_1, H_1) und 30 min. (F_2, H_2) nach der Injektion wurden erneut Quaddeln gesetzt.

2. Versuchsreihe

Entsprechend der 1. Versuchsreihe wurde 5 Ratten Heparin, 5 E pro 100 g Körpergewicht, subcutan injiziert. Die Tiere wogen 180-225 g. Vor der Medikation (F_0 , H_0), 15 min. (F_1 , H_1) und 30 min. (F_2 , H_2) nach dieser wurden Quad-
deln gesetzt.

3. Versuchsreihe

Mit 5 Ratten, die 175-210 g wogen, wurde ein Histaminkurzzeitversuch durchgeführt. Zunächst wurden die Tiere mit Evipan narkotisiert, dann eine Leerquaddel (F_0 , H_0) gesetzt. Danach wurde Histaminlösung subcutan injiziert, so dass 2 γ der Substanz 100 g Körpergewicht der Tiere entsprachen. 15 min. (F_1 , H_1) und 30 min. (F_2 , H_2) nach Applikation wurde gequaddelt.

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm					
		F_0	H_0	F_1	H_1	F_2	H_2
1	190	131	260	102	172	127	180
2	205	135	205	130	161	114	176
3	225	124	230	108	104	94	115
4	175	106	182	107	148	110	152
5	205	150	258	139	199	151	196

TABELLE 1 (1. Versuchsreihe)

Nummer d. Tieres	Gewicht i. Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm					
		F_0	H_0	F_1	H_1	F_2	H_2
6	225	139	254	145	155	127	164
7	195	131	256	126	172	131	202
8	185	128	266	132	187	146	191
9	180	115	221	112	138	100	164
10	180	121	227	119	128	136	140

TABELLE 2 (2. Versuchsreihe)

Nummer d. Tieres	Gewicht i. Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm					
		F_0	H_0	F_1	H_1	F_2	H_2
11	175	109	243	101	185	95	187
12	200	120	227	119	172	121	167
13	200	162	263	99	207	100	192
14	195	112	203	88	139	100	168
15	210	151	232	145	189	107	184

TABELLE 3 (3. Versuchsreihe)

VERSUCHSGRUPPE B

4. Versuchsreihe

Vor Beginn der Medikation wurden 12 Ratten, die 170-185 g schwer waren in Evipannarkose gequaddelt, d.h. es wurden als Leerwerte die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddel (F_0) und der Harbstoff-Hyaluronidasequaddel (H_0) bestimmt. Danach wurde täglich über 4 Wochen in leichter Äthernarkose Adrenalin (2 γ pro 100 g Körpergewicht) s.c. injiziert. Damit die Tiere auch immer die ihrem Körpergewicht entsprechende Dosis an Adrenalin bekamen, wurden sie jede Woche einmal gewogen und entsprechend der anfänglichen Gewichtsabnahme und späteren Gewichtszunahme weniger bzw. mehr Adrenalin injiziert. Nach einer applikationsfreien Zeit von 3 Wochen kamen nur 5 Tiere zur Auswertung, da ein Teil der Ratten starb, und ein anderer Teil wegen des Verlustes seiner Ohrmarken nicht zu identifizieren war. Bei diesen 5 Tieren wurden wie zu Beginn des Versuches eine Farbstoff-Quaddel (F_3) und eine Farbstoff-Hyaluronidasequaddel (H_3) gesetzt. Die Ratten wogen gegen Versuchsende 205-265 g.

5. Versuchsreihe

Vor Beginn der Medikation wurden 12 Ratten, die 135-185 g wogen, in Evipannarkose gequaddelt (F_0 , H_0). Danach wurde täglich über 4 Wochen Heparin in physiologischer Kochsalzlösung s.c. appliziert; die Tagesdosis betrug 5 E. Heparin pro 100 g Körpergewicht. Zur Erleichterung der s.c. Injektion wurden die Ratten leicht mit Äther narkotisiert. Einmal in der Woche wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert und entsprechend der allmählichen Gewichtszunahme mehr Heparin verabreicht. Nach 3 applikationsfreien Wochen wurden 7 Ratten gequaddelt. (F_3 , H_3). (Versuchsreihe 5a)

Bei den übrigen 5 Tieren wurden die Quaddeln nach 4 applikationsfreien Wochen (F_4 , H_4) gesetzt (Versuchsreihe 5b). Die Tiere wogen gegen Versuchsende 175-265 g.

6. Versuchsreihe

Der Versuch wurde mit 12 Ratten durchgeführt, die zu Beginn 145-200 g wogen. Zunächst wurden in Evipannarkose Leerquaddeln (F_0 , H_0) gesetzt. Danach wurde täglich über 4 Wochen in leichter Äthernarkose Histamin-Lösung (2 γ Histamin pro 100 g Körpergewicht) s.c. injiziert. Jede Woche wurde das Gewicht der Versuchstiere kontrolliert und entsprechend der allmählichen Gewichtszunahme mehr Histamin verabreicht. Nach 3 applikationsfreien Wochen wurden 7 Tiere gequaddelt (F_3 , H_3) (Versuchsreihe 6a), der Rest nach 4 applikationsfreien Wochen (F_4 , H_4) (Versuchsreihe 6b). Gegen Versuchsende wogen die Tiere 195-275 g.

Nummer des Tieres	Gewicht in g bei Versuchsbeginn	Fläche der Quaddeln in qmm				Gewicht in g zu Versuchsende
		F ₀	H ₀	F ₃	H ₃	
1	175	116	191	139	202	215
5	170	128	230	148	228	225
6	175	140	229	171	256	245
9	185	115	208	129	229	265
36	175	176	266	148	212	205

TABELLE 4 (4. Versuchsreihe)

Nummer des Tieres	Gewicht in g bei Versuchsbeginn	Fläche der Quaddeln in qmm				Gewicht in g zu Versuchsende
		F ₀	H ₀	F ₃	H ₃	
16	135	133	215	129	219	210
17	165	155	217	131	220	225
19	155	121	211	128	191	245
20	155	109	192	147	219	175
23	185	128	200	138	180	185
37	165	130	260	149	230	265
38	185	131	230	146	237	185

TABELLE 5a (Versuchsreihe 5a)

Nummer des Tieres	Gewicht in g bei Versuchsbeginn	Fläche der Quaddeln in qmm				Gewicht in g zu Versuchsende
		F ₀	H ₀	F ₃	H ₃	
24	165	114	179	159	213	220
26	165	100	171	128	205	235
27	155	126	201	149	223	215
28	165	116	183	146	215	235
29	200	135	197	169	225	235
34	185	110	200	178	271	195
35	185	145	235	175	291	225

TABELLE 6a (Versuchsreihe 6a)

Nummer des Tieres	Gewicht in g bei Versuchsbeginn	Fläche der Quaddeln in qmm				Gewicht in g zu Versuchsende
		F ₀	H ₀	F ₄	H ₄	
13	145	126	188	151	238	235
15	145	124	233	179	236	215
18	165	109	193	169	269	175
21	155	117	202	155	226	265
22	175	118	185	182	282	195

TABELLE 5b (Versuchsreihe 5b)

Nummer des Tieres	Gewicht in g bei Versuchsbeginn	Fläche der Quaddeln in qmm				Gewicht in g zu Versuchsende
		F ₀	H ₀	F ₄	H ₄	
25	175	118	195	185	283	275
30	175	120	191	138	229	235
31	145	123	230	186	270	225
33	185	135	294	179	287	235
32	185	104	170	169	261	225

TABELLE 6b (Versuchsreihe 6b)

STATISTISCHE AUSWERTUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse nahmen wir mit Hilfe von Varianz-Analysen vor, denen ein lineares statistisches Modell zugrunde liegt. Diese Varianz-Analysen berücksichtigen die individuelle "Reaktionslage" der Versuchstiere und geben andererseits darüber Aufschluss, ob zwischen den Diffusionsgeschwindigkeiten der Quaddel, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches abgelesen wurden, statistisch gesicherte Unterschiede bestehen. Ausserdem liefern die Varianz-Analysen eine Schätzung der experimentellen Variabilität, d. h. des Versuchs-Fehlers.

Das Ergebnis der Varianz-Analysen ist in den Tabellen 7-12 dargestellt. In den Schemata bedeutet

- n: Die Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
 SAQ: das Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
 MAQ: das Mittlere-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
 F_{emp.}: den Varianz-Quotienten zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der "Rest-Varianz";
 p: die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten F_{emp.} in der zugehörigen F-Prüfverteilung.

Bei den Kurzzeit-Versuchen konnten die beiden Quaddel-Typen, nämlich die reine Farbstoff-Quaddel und die Farbstoff-Hyaluronidasequaddel, getrennt ausgewertet werden, da hier bei jedem Versuchstier für jeden Quaddel-Typus drei Messungen vorlagen. Bei den Langzeit-Versuchen dagegen musste das Verhalten der beiden Quaddel-Typen in einer gemeinsamen Varianz-Analyse untersucht werden, da hier pro Versuchstier für jeden Quaddel-Typus nur zwei Messungen vorlagen und somit bei einem anderen Vorgehen die individuelle Reaktionslage des jeweiligen Versuchstieres nicht hätte berücksichtigt werden können. Dies hätte zu einer unzulässig hohen Schätzung für die experimentelle Variabilität geführt.

Die Unterschiede in der individuellen Reaktionslage der verschiedenen Versuchstiere kommen in den Varianz-Analysen in der "Varianz zwischen den Tieren" zum Ausdruck; die "Rest-Varianz" ist die Schätzung der Versuchs-Variabilität. Sie bildet die Grundlage der weiteren statistischen Analyse.

Es soll nunmehr zunächst das Ergebnis der Varianz-Analysen der Kurzzeit-Versuche besprochen werden. Eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit eines Quaddel-Typus liegt hier nur dann vor, wenn die Varianz-Komponente zwischen den Versuchs-Stufen gesichert grösser ist als die Rest-Varianz. Als Kriterium hierfür dient der Varianz-Quotient F_{emp} zwischen diesen beiden Varianz-Komponenten; besitzt er eine Überschreitungswahrscheinlichkeit p die kleiner als 5 % ist, so kann als statistisch gesichert gelten, dass zwischen den Diffusionsgeschwindigkeiten zu den verschiedenen Zeiten eines Versuches statistisch gesicherte Änderungen aufgetreten sind. Im einzelnen ergibt sich, dass solche gesicherten Veränderungen im Kurzzeit-Versuch für die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidasequaddel nur nach der s. c. Applikation von Adrenalin und von Histamin nachweisbar sind; eine Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel trifft bei keinem der Kurzzeit-Versuche ein.

In den Varianz-Analysen, welche den Auswertungen der Langzeit-Versuche zugrunde gelegt wurden, ist die Grösse der Varianz-Komponente "zwischen Hyaluronidase-Quaddel" dafür massgebend, ob während eines Versuches eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidasequaddel eingetreten ist. Eine entsprechende Bedeutung hat die Varianz-Komponente "zwischen Farbstoff-Quaddel" für das Verhalten der reinen Farbstoffquaddel. Auch hier müssen diese Varianz-Komponenten statistisch gesichert grösser als die Rest-Varianz sein, wenn eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit des betreffenden Quaddel-Typus vorliegen soll. Es zeigt sich, dass für die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidasequaddel eine statistisch gesicherte Veränderung nur 4 Wochen nach Absetzen der s. c. Applikation von Heparin und 3 bzw. 4 Wochen nach Absetzen der s. c. Applikation von Histamin nachweisbar ist. Eine Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoffquaddel lässt sich bei keinem der Langzeit-Versuche nachweisen.

Berechnet man für jeden Zeitpunkt t einer Versuchsreihe für einen Quaddel-

Typus das arithmetische Mittel $\bar{x}(t)$ aus allen Diffusionsgeschwindigkeiten, die zu diesem Zeitpunkt an den verschiedenen Versuchstieren beobachtet wurden, so ist die Differenz, die zwischen den Mittelwerten besteht, die zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gehören, die beste statistische Schätzung für die Veränderung, welche die Diffusionsgeschwindigkeit dieses Quaddel-Typus zwischen den betreffenden beiden Zeitpunkten erfahren hat. Bezeichnet insbesondere $\bar{x}(0)$ das arithmetische Mittel derjenigen Werte, die vor der Applikation einer Substanz beobachtet wurden, so ist die Mittelwerts-Differenz

$$\delta \bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(0)$$

ein Mass für die Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit des betreffenden Quaddel-Typus, welche durch die Applikation der Substanz bewirkt wurde.

In den Tabellen 13-18 sind die Mittelwerte $\bar{x}(t)$ und die Mittelwerts-Differenzen $\bar{x}(t) - \bar{x}(0)$ angegeben. Dem Vorzeichen dieser Mittelwerts-Differenzen kann entnommen werden, ob es sich bei der Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit um eine Hemmung handelt oder um eine Vergrösserung; bei einer Hemmung ist dieses Vorzeichen negativ, bei einer Vergrösserung positiv.

Wie sich bei den Kurzzeit-Versuchen aus dem Vorzeichen der Mittelwerts-Differenzen ergibt, liegt bei diesen Versuchen durchwegs eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität vor. Eine Sicherung für diesen Effekt konnte jedoch, wie bereits oben bemerkt, nur bei den Versuchen mit Adrenalin und Histamin erzielt werden. Bei diesen Versuchsreihen war noch zu prüfen, zu welchem der beiden Zeitpunkte die statistisch gesicherte Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität vorliegt. Hierzu dienen in den Varianz-Analysen die beiden Varianz-Komponenten "zwischen Kontrolle und Versuchszeiten" und "zwischen Versuchszeiten". Ist die Varianz-Komponente "zwischen Versuchszeiten" nicht wesentlich grösser als die "Rest-Varianz" so unterscheiden sich die beiden nach Applikation der Substanz gesetzten Quaddeln nicht wesentlich voneinander. Es liegt somit eine statistisch gesicherte Hyaluronidasehemmung zu beiden Zeitpunkten p.i. vor. Bei den Kurzzeit-Versuchen mit Adrenalin und mit Histamin ist dies der Fall; d.h. zu den Zeitpunkten 15 min. und 30 min. p.i. liegt für beide Substanzen eine statistisch hoch gesicherte Veränderung in der Hyaluronidase-Aktivität vor.

Aus dem Vorzeichen der Mittelwerts-Differenzen bei den Langzeit-Versuchen ergibt sich, dass hier durchwegs eine Vergrösserung der Hyaluronidase-Aktivität feststellbar ist, d.h. die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidase-quaddel 3 bzw. 4 Wochen nach Absetzen der Medikation ist wesentlich grösser als vor Applikation der Prüfsubstanz. Die Frage der Sicherung dieser Veränderungen wurde bereits oben diskutiert.

In den Tabellen 13-18 ist ausserdem für jeden Zeitpunkt die Varianz $s^2(t)$ zwischen den Messwerten, die zu den einzelnen Zeitpunkten beobachtet wurden, angegeben. Wenn die Voraussetzungen zutreffen, aufgrund derer die Varianz-Ana-

lysen durchgeführt wurden, müssen diese Varianzen innerhalb der gleichen Versuchsreihe und des gleichen Quaddel-Typus untereinander homogen sein. Ob dies tatsächlich der Fall ist, prüften wir mit Hilfe des BARTLETT-Tests, dessen Ergebnis unter den jeweiligen Varianz-Analysen in den Tabellen 7-12 angegeben ist. Es bedeutet hierin $\chi^2_{\text{emp.}}$ die Prüfgrösse des Tests, n die Zahl der Freiheitsgrade der Chi-Quadrat-Verteilung, p ist die Überschreitungswahrscheinlichkeit, welche die Prüfgrösse $\chi^2_{\text{emp.}}$ in dieser Prüfverteilung höchstens besitzt. Aus dem BARTLETT-Test ergibt sich kein Hinweis dafür, dass die Voraussetzungen, unter denen die statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt wurde, nicht dem realen Sachverhalt entsprechen.

Abschliessend sei noch kurz auf die experimentelle Variabilität in den vorliegenden Versuchen eingegangen. Im Vergleich zur experimentellen Variabilität anderer, vergleichbarer Versuche mit entsprechender Fragestellung, ist bei den vorliegenden Versuchen diese Variabilität sehr gross. Eine mögliche Ursache hierfür ist einmal die s. c. Applikation der Prüf-Substanzen, wodurch die individuellen Unterschiede in der Resorption als weiterer Faktor in die Versuchs-Variabilität eingeht, und ausserdem bei den Langzeit-Versuchen möglicherweise eine unterschiedliche Entwicklung der Tiere während des Beobachtungszeitraumes. Auf diese grosse Versuchs-Variabilität ist es auch zurückzuführen, dass in einigen Fällen, verhältnismässig grosse Veränderungen in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidasequaddel statistisch nicht gesichert werden konnten.

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{\text{emp.}}$	p
Zwischen Tieren	4	3.083	770'7	6'93	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	474	237'0	2'13	-
Rest-Varianz	8	889	111'1		
Gesamt-Varianz	14	4.446	317'6		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0'387; 80 \% < p.$$

Farbstoff-Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{\text{emp.}}$	p
Zwischen Tieren	4	9.771	2.442'7	5'33	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	14.952	7.476'0	16'33	1 %
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	14.829	14.829'0	32'40	0'1 %
Zw. Versuchs-Zeiten	1	122	122'0	-	
Rest-Varianz	8	3.661	457'6		
Gesamt-Varianz	14	28.384	2.027'4		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0'072; 95 \% < p.$$

TABELLE 7 (1. Versuchsreihe)

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	1.504	376'0	4'58	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	5	2'5	-	
Rest-Varianz	8	657	82'1		
Gesamt-Varianz	14	2.166	154'7		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 1'496; 30 \% < p.$$

Farbstoff-Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	5.625	1.406'2	17'13	0'1 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	22.364	11.182'0	100'00	0'1 %
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	21.708	21.708'0	100'00	0'1 %
Zw. Versuchs-Zeiten	1	656	656'0	7'99	5 %
Rest-Varianz	8	657	82'1		
Gesamt-Varianz	14	28.646	2.046'1		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0'225; 80 \% < p.$$

TABELLE 8 (2. Versuchsreihe)

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	2.489	622'2	2'22	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	1.894	947'0	3'38	-
Rest-Varianz	8	2.238	279'7		
Gesamt-Varianz	14	6.621	472'9		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 2'908; 20 \% < p.$$

Farbstoff-Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	4.332	1.083'0	12'53	1 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	9.941	4.970'5	57'53	0'1 %
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	9.937	9.937'0	100'0	0'1 %
Zw. Versuchs-Zeiten	1	4	4'0	-	
Rest-Varianz	8	691	86'4		
Gesamt-Varianz	14	14.964	1.068'9		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 2'397; 30 \% < p.$$

TABELLE 9 (3. Versuchsreihe)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	4.664	1.166	3'82	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	3	35.724	11.908	39'04	0'1 %
Zw. Farbstoff-Quaddeln	1	360	360	1'18	-
Zw. Hyase-Quaddeln	1	-	-	-	-
Zw. Quaddel-Typen	1	35.364	35.364	100'00	0'1 %
Rest-Varianz	12	3.668	305		
Gesamt-Varianz	19	44.056	2.319		

$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 1'507; 50 \% < p.$

TABELLE 10 (4. Versuchsreihe)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	6	3.411	568	2'71	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	3	47.230	15.743	75'33	0'1 %
Zw. Farbstoff-Quaddeln	1	266	266	1'27	-
Zw. Hyase-Quaddeln	1	60	60	-	-
Zw. Quaddel-Typen	1	46.904	46.904	100'00	0'1 %
Rest-Varianz	18	3.766	209		
Gesamt-Varianz	27	54.407	2.015		

$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 5'252; 10 \% < p.$

TABELLE 11a (Versuchsreihe 5a)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	1.161	290	1'02	-
Zwischen Versuchs-Stufen	3	45.103	15.034	52'94	0'1 %
Zw. Farbstoff-Quaddeln	1	5.856	5.856	20'62	0'1 %
Zw. Hyase-Quaddeln	1	5.953	5.953	20'96	0'1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	33.293	33.293	100'00	0'1 %
Rest-Varianz	12	3.405	284		
Gesamt-Varianz	19	49.669	2.614		

$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 5'361; 10 \% < p.$

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	6	9.254	1.542	8'62	0'1 %
Zwischen Versuchs-Stufen	3	50.288	16.763	93'65	0'1 %
Zw. Farbstoff-Quaddeln	1	4.754	4.754	26'56	0'1 %
Zw. Hyase-Quaddeln	1	5.480	5.480	30'61	0'1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	40.053	40.053	100'00	0'1 %
Rest-Varianz	18	3.214	179		
Gesamt-Varianz	27	62.756	2.324		

$$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 4'157; 20 \% \leq p.$$

TABELLE 12 a (Versuchsreihe 6a)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	7.507	1.877	3'65	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	3	58.265	19.422	37'79	0'1 %
Zw. Farbstoff-Quaddeln	1	6.604	6.604	12'85	1 %
Zw. Hyase-Quaddeln	1	6.250	6.250	12'16	1 %
Zw. Quaddel-Typen	1	45.410	45.410	88'35	0'1 %
Rest-Varianz	12	6.166	514		
Gesamt-Varianz	19	71.938	3.786		

$$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 8'669; 2 \% \leq p.$$

TABELLE 12 b (Versuchsreihe 6b)

	$\bar{x} (t)$	$s^2 (t)$	$\bar{x} (t) - \bar{x} (v)$	Hemmung	Sicherung
E _v	130	273			
H _v	227	1.142			
E _{15'}	117	265	- 13		
H _{15'}	157	1.224	- 70	66'9 %	0'1 %
E _{30'}	119	455	- 11		
H _{30'}	164	992	- 63	60'3 %	0'1 %

TABELLE 13 (1. Versuchsreihe)

	$\bar{x} (t)$	$s^2 (t)$	$\bar{x} (t) - \bar{x} (v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	127	85			
H_v	245	386			
$E_{15'}$	127	160	0		
$H_{15'}$	156	581	- 89	75'5 ‰	0'1 ‰
$E_{30'}$	128	295	+ 1		
$H_{30'}$	172	603	- 73	61'7 ‰	0'1 ‰

TABELLE 14 (2. Versuchsreihe)

	$\bar{x} (t)$	$s^2 (t)$	$\bar{x} (t) - \bar{x} (v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	131	582			
H_v	234	484			
$E_{15'}$	110	498	- 21		
$H_{15'}$	178	642	- 56	46'6 ‰	0'1 ‰
$E_{30'}$	105	102	- 26		
$H_{30'}$	180	130	- 54	45'6 ‰	0'1 ‰

TABELLE 15 (3. Versuchsreihe)

	$\bar{x} (t)$	$s^2 (t)$	$\bar{x} (t) - \bar{x} (v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	135	629			
H_v	225	792			
E_{3W}	147	241	+ 12		
H_{3W}	225	421	0	- 0'7 ‰	-

TABELLE 16 (4. Versuchsreihe)

	$\bar{x} (t)$	$s^2 (t)$	$\bar{x} (t) - \bar{x} (v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	129	193			
H_v	218	494			
E_{3W}	138	82	+ 9		
H_{3W}	214	426	- 4	4'9 ‰	-

TABELLE 17 a (Versuchsreihe 5a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	119	45			
H_v	200	378			
E_{4W}	167	193	+ 48		0·1 %
H_{4W}	249	526	+ 49	- 85·3 %	0·1 %

TABELLE 17 b (Versuchsreihe 5b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	121	239			
H_v	195	440			
E_{3W}	158	322	+ 37		0·1 %
H_{3W}	235	1.076	+ 40	- 70·8 %	0·1 %

TABELLE 18 a (Versuchsreihe 6a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	120	123			
H_v	216	2.365			
E_{4W}	171	394	+ 51		1 %
H_{4W}	266	535	+ 50	- 71·0 %	1 %

TABELLE 18 b (Versuchsreihe 6b)

Abkürzungen:

E = Evansblue-Farbstoffquaddel

H = Farbstoff-Hyaluronidasequaddel

3W = 3 Wochen nach Applikationsende

4W = 4 Wochen nach Applikationsende

D I S K U S S I O N

Die Untersuchungen der Versuchsreihen 1-3 haben zunächst ergeben, dass Adrenalin, Heparin und Histamin auch bei s.c. Applikation in geeigneter Dosierung eine hyaluronidasehemmende Wirkung in vivo entfalten. Die bisherigen Untersuchungen von MATHIES und Mitarbeitern (1, 13, 14, 19) wurden mit i.v. Gaben vorgenommen. Damit war die Möglichkeit gegeben, bei Applikationsserien über längere Zeiträume mit den genannten Substanzen die s.c. Applikation durchzuführen. Die Ergebnisse der Versuchsreihe 4 zeigen, dass 3 Wochen nach Beendigung einer vierwöchigen täglichen Adrenalinapplikation keine Beeinflussung des Hyaluronidase-Spreadings gefunden wird. Das Gleiche gilt für die Nachwirkung

einer vierwöchigen täglichen Heparinapplikation (Versuchsreihe 5a). Dagegen ist 4 Wochen nach Beendigung der Heparinapplikation, (Versuchsreihe 5b), eine Steigerung der Hyaluronidaseaktivität festzustellen. Diese ist zunächst nicht zu erklären.

Nach vierwöchiger täglicher Histaminapplikation ist diese Hyaluronidaseaktivitätssteigerung bereits 3 Wochen nach Abschluss der Applikationsserie (Versuchsreihe 6a) deutlich und wird auch nach 4 Wochen (Versuchsreihe 6b) in noch stärkerem Ausmass festgestellt. Auch für dieses Verhalten gibt es vorerst keine Erklärung. Die Versuchsergebnisse besagen lediglich, dass im Gegensatz zu den untersuchten Substanzen wie Acetylsalicylsäure, Chloraethylbenzmethoxanzon, Chloroquin, Oestroneulfat und den Moorbädern 4 Wochen nach einer vierwöchigen Applikation keine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität festzustellen ist. Damit gewinnt die Annahme an Wahrscheinlichkeit, dass die genannten hyaluronidasehemmenden Substanzen eine Nebennierenmark-Aktivierung bedingen, die bei länger dauernder Applikation auch über einen längeren Zeitraum anhält. Die vermutlich am Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Substanzen beteiligten körpereigenen Stoffe, Adrenalin, Heparin und Histamin dürften von sich aus keine Nachwirkung über den genannten Zeitraum von mindestens 4 Wochen besitzen.

Erwähnt werden muss, dass die Untersuchungsergebnisse eine relativ grosse Streubreite bei der statistischen Auswertung ergeben haben. Diese dürfte in erster Linie durch die gewählte Versuchsanordnung bedingt und zu erklären sein. Naturgemäss sind die Reaktionen der Versuchstiere beim chronischen Versuch grösseren Schwankungen unterworfen wie beim akuten Versuch. Diese Tatsache dürfte sich besonders bei den Bestimmungen nach dem applikationsfreien Intervall auswirken, wobei die individuellen und zeitlichen Schwankungen bei den einzelnen Versuchstieren deutlicher zutage treten. Daneben ist zu diskutieren, ob die s. c. Applikation Ergebnisse mit grösserer Irrtumswahrscheinlichkeit im Gegensatz zur i. v. Gabe bringt.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit Hilfe eines Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading-Testes wurde die in vivo hyaluronidasehemmende Wirkung des Adrenalins, Heparins und Histamins auch bei s. c. Applikation bestätigt. Eine Nachwirkung über 3-4 Wochen im Anschluss an eine vierwöchige tägliche Applikation besteht nicht, es wurde im Gegenteil bei Heparin und Histamin eine Steigerung der Hyaluronidaseaktivität gefunden, die vorerst nicht erklärt werden kann. Auf Grund bisher vorliegender Untersuchungsergebnisse sprechen die Versuche der vorgelegten Arbeit dafür, dass hyaluronidasehemmende Stoffe wie Salicylate, Oestroneulfat, Chloroquin und andere bei länger dauernder Gabe durch Aktivierung des Nebennierenmarkes über längere Zeiträume wirksam sind.

Herrn Prof. Dr. W. SEITZ danke ich für die Überlassung des Themas.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. H. MATHIES für die Anregung zur vorgelegten Arbeit sowie für die Hilfe bei ihrer Durchführung.

Herrn Dipl. Math. K. LIEBRICH sage ich Dank für die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. MATHIES H. und JANKOWSKI A.:
Klin. Wschr. 35 1676 (1957).
2. MATHIES H.: —, Arzneimittelforschung 8 233 (1958).
3. MATHIES H. und v. WERTHER G.:
Arzneimittelforschung 9 576 (1959).
4. MATHIES H.: Zschr. ges. exper. Med. 131 118 (1959).
5. MATHIES H., BIECHELE I. und HARTMANN M.:
Ärztl. Forsch. im Druck.
6. MATHIES H. und v. WERTHER G.:
Zschr. angew. Bäder-Klimahk. 5 582 (1958).
7. MATHIES H.: Zschr. Rheumaforsch. 18 308 (1959).
8. MATHIES H.: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 64. Kongr. 1958.
9. MATHIES H.: Zschr. Rheumaforsch. 18 205 (1959).
10. MATHIES H.: Pharmazie 14 429 (1959).
11. MATHIES H.: 6. International. Kongr. f. Universelle Moorforsch. Juni 1958
Spa.
12. DOMENJOZ R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225 14 (1955).
13. MATHIES H.: Arch. int. pharmacodyn. CXXIII 334 (1960).
14. MATHIES H., GLÜCK, A., POULANTZAS J. und SCHMIDT D.:
Med. Exp. 1 64 (1959).
15. MATHIES H., OESTREICH G. und SCHWALBACH K.:
in Vorbereitung.
16. EICHHOLTZ: Lehrbuch der Pharmakologie Springer, Berlin-Göttingen-
Heidelberg (1957) 80.
17. SCHEUFELE R.: Diss. München 1958.
18. MATHIES H. und SCHLIERF G.:
in Vorbereitung.
19. MATHIES H.: Verh. Dtsch. Ges. f. Inn. Med. 65. Kongr. 1959.
20. WERLE R. und AMANN R.:
Naturwissenschaften 42 583 (1955).
21. PROBST M.: Diss. München in Vorb.

22. SCHWANK M.; Diss. München in Vorb.
23. ESPER U.; Diss. München in Vorb.
24. FUMY A.; Diss. München 1959.
25. HAUPT E.; Diss. München 1959.
26. WILHELMI G.; zitiert Domenjoz. R. (12).
27. MANDINAVEITIA J.;
Biochemic J. 32 1806 (1938).
28. MANDINAVEITIA J.;
Biochemic J. 33 347 (1939).
29. GIBIAN H.; Ergeb.d.Enzymforsch. 13 1 (1954).

L E B E N S L A U F

Am 20. September 1936 wurde ich als Tochter des Verwaltungsinspektors Wilhelm Müller und seiner Ehefrau Edith, geb. Wädlich, in Frankfurt/Main geboren. Da mein Vater bereits 1941 fiel, lag meine Erziehung allein in den Händen meiner Mutter.

Nach den mit mannigfachem Schulwechsel verbundenen Volksschuljahren von 1942-47 wurde ich in die St. Ursula-Oberschule für Mädchen in Neheim-Hüsten aufgenommen. Ab Herbst 1948 besuchte ich die Bettina-Schule, Realgymnasium für Mädchen in Frankfurt/Main, und bestand im März 1956 an dieser Schule die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1956 begann ich mein Medizinstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt/Main. Dort legte ich im Oktober 1958 die ärztliche Vorprüfung ab. Die ersten drei klinischen Semester studierte ich an der Universität München, wo ich die Experimente zur vorgelegten Arbeit durchführte. Ich beendete mein Studium in Frankfurt/Main und bestand am 29.1.1962 die ärztliche Prüfung.

Am 27.2.1962 heiratete ich Dr. med. Jochen Bauke.

